云 南 植 物 研 究 1992; **14** (2): 179—186
Acta Botanica Yunnanica

BA 田间预处理对大麦花药若干生理性状和培养效率的影响*

钟华鑫　潘向群　陈汉民　郁昭愈　梁海曼

(杭州大学生物系，杭州 310012)

摘要　用 BA 5、20、50 mg／l 的 0.1%吐温−80 溶液田间喷施大麦植株上部的功能叶，以喷水和喷 0.1%吐温−80 作为双对照，研究其对大麦花药培养的影响，结果表明：(1) 喷施 0.1%吐温−80 可提高花粉愈伤组织诱导率，喷施 BA 5 mg／l 的 0.1%吐温−80 可进一步提高愈伤组织诱导率。(2) 喷水和喷吐温−80 的，其愈伤组织只分化白化苗，分化率分别为 22.2%和 60%；喷 BA 5mg／l 的没有明显降低白苗率，但显著促进了绿苗的分化，频率为 32.7%。(3) 电镜观察证实 BA 对花药药壁有延缓衰退的作用，单纯吐温−80 无此作用，表明绿苗的分化和药壁的活力有关。(4) BA 对花药内的矿质元素含量状况产生复杂的影响，也影响花药内源 ABA 的水平及过氧化物酶同工酶谱。

关键词　大麦；花药培养；BA−预处理；吐温−80；白苗

EFFECTS OF BENZYLADENINE(BA) ON THE SOME PHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND THE CULTURED EFFICIENCIES OF ANTHERS IN BARLEY

ZHONG Hun−Xin, PAN Xiang−Qun, CHEN Han−Min,
YU Zhao−Yu, LIANG Hai−Man

(*Department of Biology, Hangzhou University,* Hangzhou 310012)

Abstract　The upper leaves of anther donor plants of barley bearing anthers at the early uninucleate stage of pollen were sprayed with BA 5, 20 and 50 mg／l containing 0.1% TWeen−80. The effects of BA−spraying on anther cultures were as follows:

1. Treated with 0.1% TWeen−80 (CK Ⅱ), the formation of pollen callus in barley anthers was increased, and treated with BA 5 mg／l containing 0.1% TWeen−80, the formation of pollen callus was further increased.

2. Pollen callus treated with H_2O (CK Ⅰ) and 0.1% TWeen−80 (CK Ⅱ) were found to only differentiate albino plantlets without formation of normal green shoots, the percentage of

1991年3月收稿，同年6月定稿。
* 国家自然科学基金资助项目。

albinos were 22.2% and 60.0% respectively. However, the pollen callus treated with BA 5 mg / l were found not only to differentiate albino plantlets with 55.1%, but also to product a lot of normal green shoots with 32.7%. It suggested that BA could obvously enhance the differentiation of green shoots.

3. Electron micrographies showed that treated with BA, the degenerative course of anther walls of harley was delayed. The walls developed substantially and cells were rich in contents. But the anthers walls after treatment with H_2O and 0.1% TWeen-80 appeared to quickly degenerate. It indicated that the differentiation of green shoots from pollen callus related to the viability of anther wall tissues.

4. The effects of BA on the contents of mineral elements within anthers appeared to be very complicate, and it seems to be possible that the ratio of Mn / Cu in anthers related to the differentiation of green shoots.

5. Treatment with BA influenced also the level of endogenous ABA and the zymogram of peroxidase isozymes in anthers. These influences might associate with enhancing the differentiation of green shoots from pollen callus by the treatment with BA.

Key words *Hordeum vulgare*; Anther culture; BA-pretreatment; TWeen-80; Albino plantlets

大麦花药培养的花粉绿苗率很低而白化苗大量发生[1-4]，严重地影响了大麦花药培养在育种上的应用。我们曾在水稻花药培养研究中发现，花药离体时和培养过程中，其药壁的状态与培养效率紧密相关[5, 6]，大多数禾谷类作物花药培养效率低的原因之一，就是由于在花药培养过程中药壁组织过快衰退所致[7, 8]。同时，我们已试验证明 BA (6-bengyladenine) 田间喷施植株可以明显防止离体后大麦花药药壁组织的过早衰退，有利于提高花药培养效率（钟华鑫等，待发表）。为进一步确定 BA 田间喷施的适宜浓度，并探讨 BA 喷施促进花药培养效率的生理原因，进行了本试验。

材料与方法

材料 大麦品种为“杭 88060”（*Hordeum vulgare* L. cv. "Hang 88060"），栽培于杭州大学生物系农场。

田间喷施处理 在花粉为单核前期时，用含 BA5、20、50 mg / l 的 0.1%吐温-80 溶液田间喷施大麦植株的上部功能叶，同时以喷施水和 0.1%吐温-80 作为双对照。喷施液量以完全喷湿叶片，有水下滴为准。

低温处理 喷施后 7 天，取花粉为单核中、后期的麦穗，置于 7—10℃ 冰箱内进行常规低温处理 21 天。

花药培养 低温处理后的花药，一部分用作各种分析，一部分用于花药培养。诱导培养基以 C17 和改良 C17（B4）为基本培养基，附加 2,4-D 2 mg / l，BA 0.5 mg / l 和 9%蔗糖，25℃ 暗培养诱导花粉愈伤组织。分化培养基为 MS，附加 BA 0.2 mg / l 和 4.5%蔗糖，25℃ 光照培养。

矿质元素含量的测定 花药样品用高氯酸和硝酸（1 : 5）10 ml 加热消化至干涸，将白色粉末用

几滴浓 HCl 溶解，再用蒸馏水定容后，K、Ca、Mg、Fe、Mn、Zn、Cu 等用 WFX-IF_2 原子吸收分光光度计，P 用 RF540 萤光光谱分析仪测定。

ABA 放射免疫测定　按照 Weiler [9, 10] 方法。

过氧化物酶同工酶的电泳分析　参照方国伟和梁海曼 [7] 的方法。

细胞学观察　参照钟华鑫等 [8] 的方法。花药经酒精-丙酸（3：1）固定液固定 24h 后，递级转入 70%酒精中，置冰箱内保存。染色采用"丙酸-铁-泽红-水合氯醛"（PICCH）溶液 [11]，染色后压片观察，每份样品每次取 10 个花药，每个花药观察统计 100 粒花粉，共 1 000 粒花粉。

花药超薄切片制作和电镜观察　参照方国伟和梁海曼 [7] 的方法。花药经 2%戊二醛固定 12h，用 pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗数次后，再用 1%锇酸后固定 12h，水洗后用系列丙酮脱水，再过渡到包埋剂——环氧树脂 Epon 812，经渗透、包埋、聚合获得包埋块，用 LKB-8800 型超薄切片机切片，醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色，在 H-300 型电子显微镜下观察。

实验结果

1. BA 对大麦花药愈伤组织诱导的影响

从表 1 可以看出，田间喷施 0.1%吐温-80（对照Ⅱ）也可以提高大麦花药愈伤组织的诱导率，与喷水（对照Ⅰ）相比，提高幅度在 161—276%之间。但田间喷施含 BA 5 mg／l 的 0.1%吐温-80 溶液，则使大麦花药愈伤组织诱导率进一步显著提高，提高的幅度为喷吐温-80（对照Ⅱ）时的 306—158%，而为喷水（对照Ⅰ）的 490—440%。田间喷施 BA 20 mg／l 的 0.1%吐温-80 溶液，则不能提高愈伤组织诱导率。表明吐温-80 可以提高愈伤组织诱导率（C／A%），BA 也可以提高愈伤组织诱导率，但在 BA 浓度过高时，则不仅不能促进愈伤组织的诱导，还会抑制吐温-80 的促进作用。表 1 还显示，愈伤组织诱导频率提高的幅度随所用基本培养基种类的不同而异。

表 1.　BA 对大麦花粉愈伤组织诱导的影响

Table. 1.　Effect of BA on the induction of pollen callus in barley

	接种的花药数		形成愈伤组织的块数		诱导率(%)	
	B4	C17	B4	C17	B4	C17*
H_2O (Control Ⅰ)	262	264	5	4	1.91	1.52
0.1%吐温-80 (Control Ⅱ)	227	288	7	12	3.08	4.17
BA 5 mg／l	456	318	43	21	9.43	6.60
BA 20 mg／l	333	208	4	4	1.20	1.92

* 为诱导培养基（Media of induction）

* * Control Ⅱ／Control Ⅰ为 3.08／1.91—4.17／1.52＝1.61—2.76
BA5／Control Ⅱ为 9.43／3.08—6.60／4.17＝3.06—1.58

2. BA 对愈伤组织分化潜力的影响

如果如表 2 所示：喷水的对照，其愈伤组织分化较差，只分化产生少数白化苗，没有得到绿苗，愈伤组织的白苗分化率为 22.2%。喷施 0.1%吐温-80 的另一组对照，也没有分化产生绿苗，愈伤组织的白苗分化率却高达 60%。喷施 BA 5 mg／l、0.1%吐温-80 溶液的愈伤组织，除白苗分化率达 55.1%，与对照Ⅱ相近似外，还分化产生较多的

绿苗，绿苗分化率为 32.7%。喷施 BA 20 mg／l 的愈伤组织则白苗率回到喷水对照的水平，而绿苗率仍保持在 33.3%，与喷施 BA 5 mg／l 的相同。表 2 中的 4 个处理，有 3 个处理转入分化培养的愈伤组织块数较少，但实验结果显示了明显的规律性。

表 2. BA 对大麦花粉愈伤组织分化的影响

Table 2. Effect of BA on the differentiation of pollen callus in barley

	转入分化培养的愈伤组织块数	愈伤组织的分化			总分化率 (%)	白苗率 (%)	绿苗率 (%)
		白苗	根	绿苗			
H_2O (Control Ⅰ)	9	2	0	0	22.2	22.2	0
0.1%吐温-80 Control Ⅱ	10	6	1	0	70.0	60.0	
BA 5 mg／l	49	27	2	16	91.8	55.	32.7
BA 20 mg／l	6	2	0	2	66.6	33.3	33.3

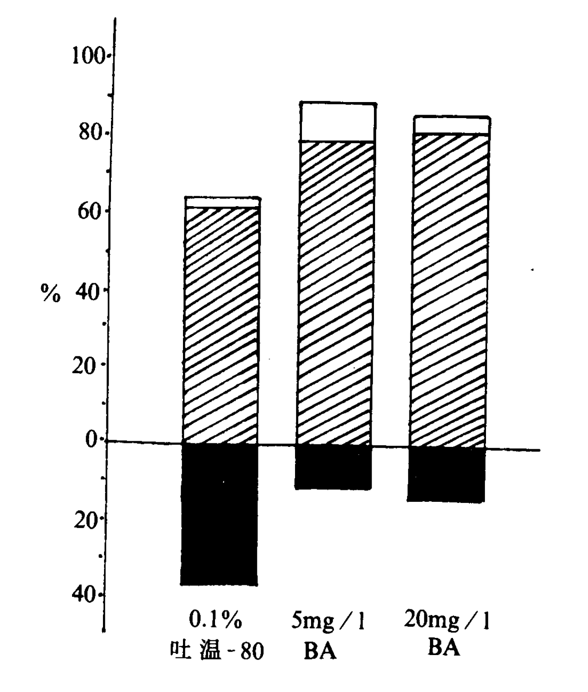


图 1. BA 处理对大麦花粉发育的影响

(低温处理后观察，低温处理前均为 100%单核花粉)

Fig.1 Effect of BA on the development of pollens in barley (Observation after cold treatment, 100% uninucleate pollens before cold treatment)

■ 死亡花粉 (dead pollens);

▨ 单核花粉 (uninucleate pollens)

□ 双核和多核花粉 (binucleate and multinucleate pollens)

以上结果表明：(1) 0.1%吐温-80 喷施不仅能提高愈伤组织诱导率，还能促进愈伤组织的分化潜力，可惜增加的仍是白化苗，不能促进正常绿苗的形成。(2) 0.1%吐温-80 中含 BA 时，才能促进绿苗的分化，而且 BA 浓度由 5 mg／l 升高到 20 mg／l 时还会抑制吐温-80 所促进的白化苗发生。(3) 田间处理麦穗时，BA 的作用不同于吐温-80 的作用。

3. BA 对大麦花粉发育和花药药壁组织的影响

观察统计了低温处理后各处理花药中的花粉发育状况，可以看出（图 1)：BA 处理的花药内，花粉细胞的死亡百分率明显少于喷施吐温-80（对照Ⅱ)，仅为它的 1／3 或略多于 1／3，双核和多核花粉细胞则为对照Ⅱ的 1.5—3.5 倍，其中 BA 5 mg／l 又优于 BA 20 mg／l 处理的。

再从图版Ⅰ可以看出：低温处理后，BA 5 mg／l 处理的花药药壁的绒毡层已开始解体，但仍较厚，细胞内容物仍较丰富，中层细胞尚残存，核已不可见，而内壁层和表皮细胞则发育良好，核大而胞质内容充实。喷水和单纯喷吐温-80 的花药药壁组织则已不可见绒毡层和中层，内壁层和表皮细胞也已呈现衰退趋势，表明 BA 处理可明显地延缓药壁组织的衰退进程，促

进活力的保持，而单纯喷吐温-80 则无此作用。

以上事实表明：BA 处理可以增加低温处理期间花粉细胞的存活率，促进花粉细胞的去分化启动。BA 处理还有利于保持药壁组织的活力。考虑到药壁组织对花粉细胞的营养供应作用，BA 对花粉发育和药壁发育的影响，两者之间应该是有联系的。

4. BA 喷施影响花药内矿质元素含量变化

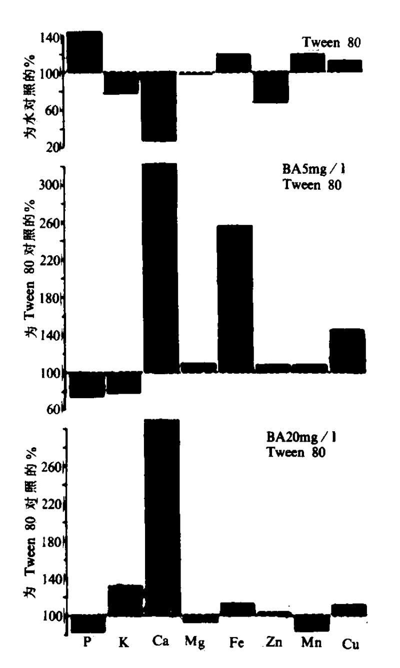


图 2. 低温处理后田间不同处理大麦花药的矿质元素含量状况

Fig.2 Effects of BA on the contents of mineral elements in barley anthers after cold-treatment

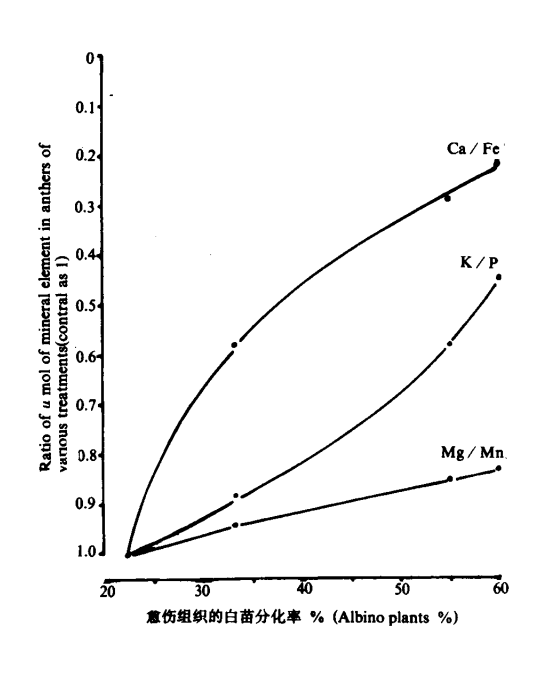


图 3. 愈伤组织的白苗率和花药接种前花药矿质元素 μ mol 比值之间的关系

Fig.3 Relation between the % of albino plants and the ratio of mineral elements content (μ mol／mg)

对经低温处理后的各处理组大麦花药进行了矿质元素含量状况的分析，从图 2 可以看出：喷施 0.1%吐温-80 和喷水的对照相比，花药内 Ca 含量显著下降，K 和 Zn 的含量略下降，P 的含量有所上升，Fe、Mn、Cu 也略有上升。0.1%吐温-80 中添加 BA 后，花药中矿质元素含量状况有明显变化。喷施 BA 5mg／l 的 0.1%吐温-80 溶液，使接种前的花药内 Ca、Fe、Cu 含量明显上升，P 含量回降；使 K 的含量比喷吐温-80 的对照Ⅱ有进一步下降。喷施 BA 20 mg／l 的，则花药内的 Ca 含量同样明显升高，K 含量回升，而 Fe、Cu 含量的上升幅度明显小于 BA 5 mg／l 处理的。显然 BA 20 mg／l 和 5 mg／l 处理的影响是不同的。以上结果显示吐温-80 和 BA 的喷施均会使大麦花药内的矿质元素含量状况带来复杂的影响。

对各处理花药中的矿质元素含量状况和愈伤组织的白苗率、绿苗率之间的关系进行反复比较，我们发现某些矿质元素间的 μ mol 比值的大小和白苗率之间存在相关的迹象。如图 3 所示，Ca／Fe、K／P、Mg／Mn 的 μ mol 比值和白苗率呈反相关。还

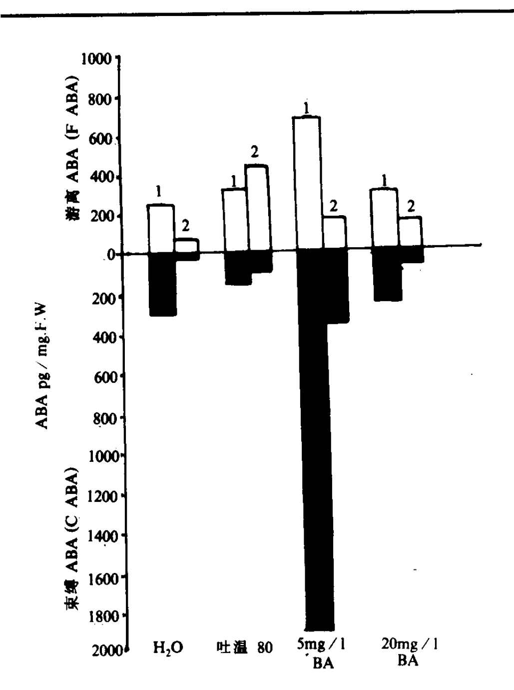


图 4. BA 对大麦花药内源 ABA 状况的影响

1. 低温处理前的花药；2. 低温处理后的花药

Fig.4 Influence of BA on ABA level in anthers of barley

1. Anthers before cold treatment; 2. Anthers after cold treatment

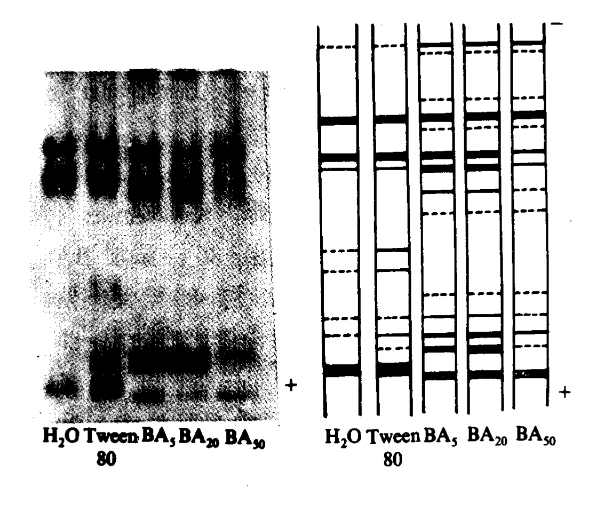


图 5. 大麦花药内的过氧化物酶同工酶谱

(低温处理前)

Fig.5 Zymograms of peroxidase isozymes in barley anther (before cold-treatment)

应注意到，能得到绿苗的 BA 5 mg / l 和 20 mg / l 的处理，花药内的 Mn / Cu μ mol 比值均明量较低，似乎表明花药内 Mn、Cu 含量与绿苗分化有关。当然，以上情况是偶然现象还是规律性的关系，有待于进一步研究，不过总是提示我们应该对外植体的矿质元素含量状况，尤其是微量元素的含量状况，予以足够的注意。

5. BA 对花药内源 ABA 含量的影响

图 4 所示，喷 0.1%吐温-80 溶液使大麦花药内的游离 ABA 水平显著升高；喷 BA 5 mg / l 的花药，在低温处理前，游离 ABA 水平上升的幅度更大，而低温处理后又有较大幅度的回降，但仍然显著高于喷水的对照。鉴于目前禾谷类植物的花药培养中已较多地使用 ABA 于诱导培养基，如 Torrizo 和 Zapata[12] 用于水稻，而本试验中 BA 5 mg / l 和 20 mg / l 处理既使花粉愈伤组织有相同的绿苗分化率，又使接种前的花药有相同的游离 ABA 水平，看来 BA 处理对花药中游离 ABA 含量的影响是值得注意的，可能与 BA 处理影响绿苗的发生有某种联系。

6. BA 对花药过氧化物酶同工酶的影响

图 5 所示，喷施 0.1%吐温-80 使低温处理前的花药中过氧化物酶同工酶谱与喷水对照有明显差异，表现出中性和酸性过氧化物酶同工酶的活性增强。Cattle 和 Kolattukudy[13] 报告过 ABA 诱导强酸性过氧化物酶的发生，而本试验中，吐温-80 可明显地提高花药内源 ABA 含量，因此，吐温-80 处理后花药内酸性过氧化物酶活性的增强是否反映了内源 ABA 水平的上升，值得注意。喷施 BA 5 mg / l 和 20 mg / l 的花药，除酸性过氧化物酶活性增强外，碱性过氧化物酶同工酶的带数也有所增加。鉴于碱性过氧化物酶具有

IAA氧化酶的功能[14, 15]，喷施BA使碱性过氧化物酶同工酶活性增强，显然会影响花药内源IAA水平，这是值得注意的。

讨 论

大麦花药培养中的一个突出问题是花粉愈伤组织在分化培养时绿苗再生率很低而白苗发生率高。关于白化苗发生的条件及发生机理，从七十年代以来已发表了不少研究报告，但大多数是从培养因素[16, 17]、培养方法[18, 19]、供体植株的环境影响[20]、基因型影响[21]、基因突变[22]、质体发育状况[23]等方面进行研究，很少有从药壁发育和从生理角度进行研究的报告。我们在花药培养中，长期来一直重视药壁组织发育状况对花粉去分化启动和再生植株的深刻影响[5—8]。由于籼稻花药培养中花粉白苗率比粳稻高得多，而籼稻的花药药壁远较粳稻的容易早衰，我们也设想花药培养中花粉白苗的发生与药壁的早衰有一定关系。因此，在大麦花药培养研究中，针对大麦花粉白苗率高，药壁也易早衰的特点，重点研究设法延缓大麦花药药壁的衰退。我们已证实田间喷施BA可延缓离体大麦花药药壁的衰退[24]，本文进一步证实田间喷施适宜剂量的BA时，不仅明显延缓离体花药壁的衰退，促进药壁组织的充实，而且显著提高愈伤组织绿苗分化率。本试验意外地发现，吐温-80处理可明显促进愈伤组织的芽分化率，但全是白化苗，而电镜切片观察表明吐温-80完全没有延缓药壁衰退的作用。这一事实暗示花粉愈伤组织分化芽的能力并不明显受药壁早衰的影响，但正常绿苗（叶绿体正常发育）的分化则需要药壁组织存在较长时间的活力。这事实也旁证白苗的发生与药壁过早衰退之间的某种联系。当然要弄清和确定药壁组织和绿苗分化之间关系的机理，还有待于进一步研究。

总之本试验得到下列结果：(1) 吐温-80显著促进白苗发生而不能提高绿苗率。(2) BA 5 mg／l添加后，使愈伤组织分化绿苗，频率达32.7%，但并不明显降低白苗率。(3) BA 20 mg／l处理，绿苗率为33.3%，与BA 5 mg／l处理相同，而白苗率却下降为33.3%。 (4) 吐温-80促进白化苗发生的同时，并不影响药壁的衰退进程，暗示在一定条件下，正常绿苗的发生和白苗的分化是相对独立的，而不是相互排斥的。这一线索当然还需进一步实验证实。如果事实确实如此，那将会加深我们对白苗发生机理的认识。

致谢 本系中心实验室杜英同志参加显微镜观察工作。

参考文献

〔1〕Kao K N. Plant formation from barley anther cultures with ficoll media. *Z Pflanzenzucht* 1981; **103**: 437—443

〔2〕Xu Z H, Sunderland N. Inoculation density in the culture of barley anthers. *Scient Sinic*. 1982; **25**: 961—968

〔3〕Lorz H, Gobel E, Brown P. Advances in tissue culture and progress towards genetic transformation of cereals. *Plant Breed* 1988; **100**: 1—25

〔4〕京正晴. 花粉かちの植物体再生. 细胞工学 1988; **7**: 932—942

〔5〕梁海曼，钟华鑫，余象煜. 花药培养中花粉去分化启动条件和药壁变化的研究. 植物生理学报 1980; **6**: 19—27

〔6〕钟华鑫，梁海曼. 药壁对花粉去分化的影响. 杭州大学学报（自然科学版）1981; **8**: 187—195

〔7〕方国伟，梁海曼. 低温预处理影响水稻花药培养效率的机理初探. 植物生理学报 1985; **11**: 366—380

〔8〕钟华鑫，方国伟，梁海曼. 低温预处理影响籼稻花药培养效率的研究. 植物生理学报 1987; **13**: 144—153

〔9〕Weiler E W. Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta* 1979; **144**: 255—264

〔10〕Weiler E W. Radioimmunoassay for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 1980; **148**: 262—272

〔11〕河北农业大学总校园艺系选种教研组. 在观察蔬菜作物染色体上丙酸-铁-洋红-水合三氯乙醛 (PICCH) 染色新技术. 遗传学报 1977; **4**: 82—83

〔12〕Torrizo L B, Zapata F J. Anther culture in rice: 4. The effect of abscisic acid on plant regeneration. *Plant Cell Rep* 1986; **5**: 136—139

〔13〕Cattle W, Kolattukudy P E. Abscisic acid stimulation of suberization: Induction of enzymes and deposition of polymeric components and associated waxes in tissue cultures of potato tuber. *Plant Physiol* 1982; **70**: 775—780

〔14〕Gaspar Th, Penel C, Gastillo F J, Greppin H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its siginficence for growth and development. *Physiol Plant* 1985; **84**: 418—423

〔15〕Ueng P P, Daly S M. Comparison of indole-acetic acid oxidation in peroxidases from rustifected resistant wheat leaves. *Plant Cell Physiol* 1985; **26**: 77—87

〔16〕王敬驹，孙敬三，朱至清. 离体培养因素对水稻花粉白苗发生的影响. 植物学报 1977; **19**: 190—198

〔17〕陈英. 水稻花药及游离花粉培养. 胡含、陈英主编. 植物体细胞遗传与作物改良. 北京: 北京大学出版社, 1988: 27—67.

〔18〕Powell W, Borrino E M, Gordall V. The effect of anther orientation on microspore-derived plant production in barley (Hardeum vulgare L.) *Euphytica* 1988; **38**: 159—163

〔19〕Zhou H, Konzak C F. Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. *Crop Sci* 1989; **29**: 817—921

〔20〕Bjlrnstad Å, M-G Opsahl-Ferstad, Aasmo M. Effect of donor plant environment and light during incubation on anther cultures of some spring wheat (Triticum aestivum L.) cultivars. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1989; **17**: 27—37

〔21〕Tuvesson I K D, Pederson S, Andersen S B. Nuclear genes affecting albinism in wheat (Triticum aestivum L.) anther culture. *Theor Appl Genet* 1989; **78**: 879—883

〔22〕张玉麟，王镇圭，过全生. 水稻花粉白苗的若干特性及其成因的探讨. 遗传学报 1988; **15**: 174—180

〔23〕陈湘宁，李玉湘，李继耕. 水稻小麦花药培养白化苗质体亚微结构和蛋白质的研究. 遗传学报 1988; **15**: 95—101

〔24〕钟华鑫，周菊华，张飞联，梁海曼. 6-BA对大麦花药培养效率的影响. 广西植物 1991; **11**: (待发表)

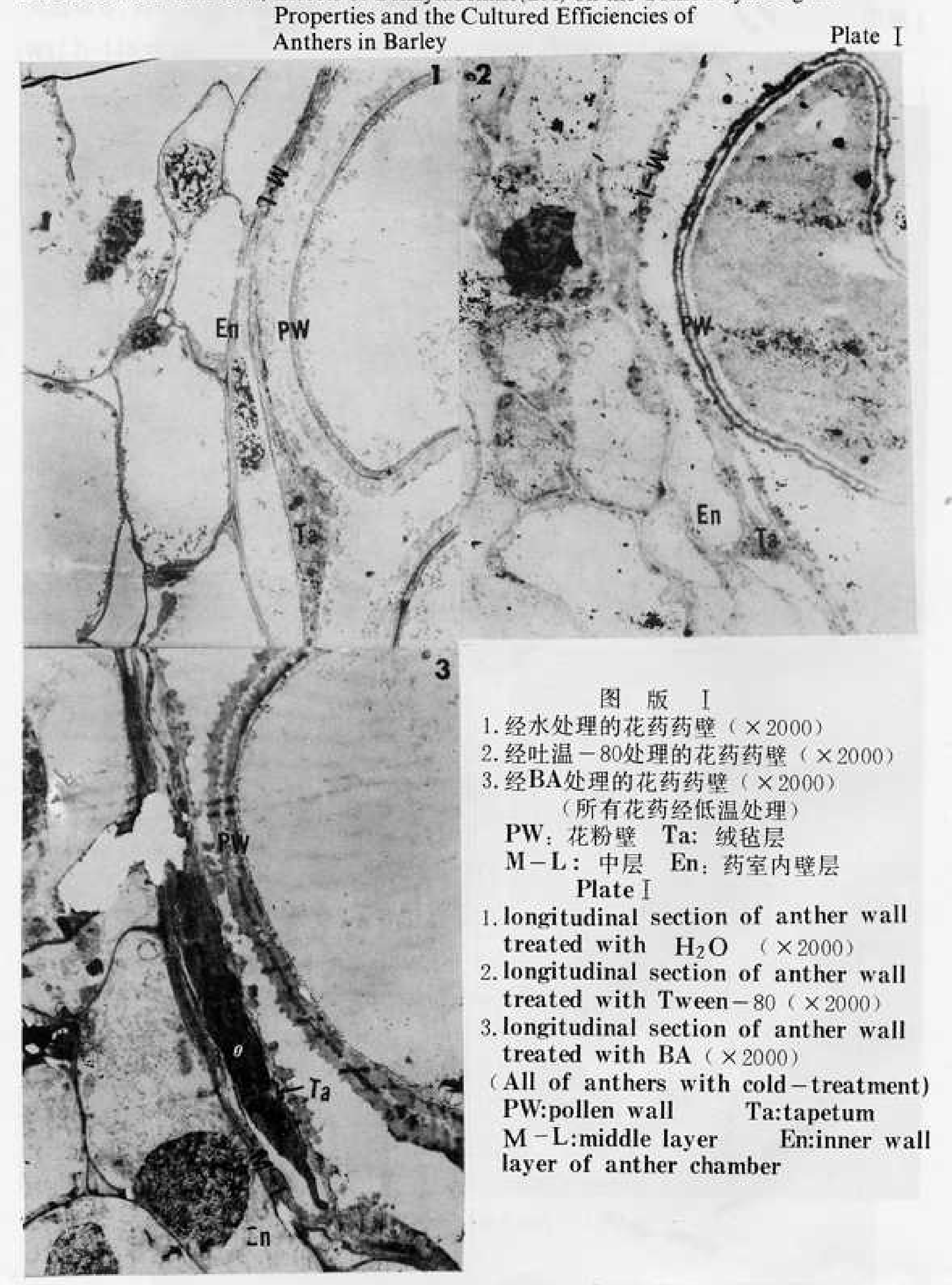


图　版　I

1. 经水处理的花药药壁（×2000）
2. 经吐温－80处理的花药药壁（×2000）
3. 经BA处理的花药药壁（×2000）

（所有花药经低温处理）

PW：花粉壁　Ta：绒毡层
M－L：中层　En：药室内壁层

Plate I

1. longitudinal section of anther wall treated with H_2O (×2000)
2. longitudinal section of anther wall treated with Tween-80 (×2000)
3. longitudinal section of anther wall treated with BA (×2000)

(All of anthers with cold-treatment)

PW:pollen wall　Ta:tapetum
M-L:middle layer　En:inner wall layer of anther chamber